Machine Translated by Google

www.mwgfd.org

FAKTABLAD PCR

af Klaus Steger & Ulrike Kämmerer

af Klaus Steger & Ulrike Kämmerer

"Hans (note: Kary Mullis) opfindelse er yderst original og betydningsfuld,"
"en opdeling af biologien i to epoker, før PCR og efter PCR" [1]

HISTORIE - Polymerasekædereaktion (PCR) muliggør hurtig og eksponentiel amplifikation af millioner til milliarder af kopier fra en ekstremt lille mængde af enhver DNA-sekvens af interesse. Baseret på konceptet "reparationsreplikation [2]" udvidede og forbedrede **Kary Mullis** (28. december 1944 - 7. august 2019) teknikken ved at anvende gentagen termocykling. I 1993 blev han tildelt Nobelprisen i kemi sammen med Michael Smith. Senere blev en varmestabil DNA-polymerase inkorporeret i processen.

"Med PCR kan man, hvis man gør det ordentligt, finde næsten hvad som helst i hvem som helst." [3]

PRINCIP - PCR omfatter en sekvens af **30-35 DNA-amplifikationscyklusser,** som hver består af følgende tre trin:

1. **Denaturering** (94-98 °C): Separation af den dobbeltstrengede DNA-skabelon i to enkeltstrengede DNA-skabeloner tråde.

2. **Annealing** (60-65 °C): Binding af et specifikt primerpar, der repræsenterer korte enkeltstrengede DNA-startersekvenser placeret i begge ender af den pågældende DNA-sekvens, og som dermed definerer det "mål", der skal amplificeres.

3. **Forlængelse** (72 °C): Forlængelse af primerstartersekvenserne ved hjælp af DNA-polymerase, det enzym der kopierer DNA i celler, hvilket endelig resulterer i den DNA-målsekvens, der er komplementær til DNA-skabelonsekvensens.

DNA-produktet fra hver cyklus fungerer som udgangsmateriale for den følgende cyklus, hvilket muliggør eksponentiel amplifikation af den indledende målsekvens. På grund af sin specifikke størrelse kan PCR-slutproduktet analyseres på en agarose- eller en polyacrylamidgel.

I **COVID-19 PCR-testene** anvendes **realtids-PCR** til at detektere specifikke SARS-CoV-2-sekvenser, hvilket involverer en tredje primer. Denne såkaldte "probe" er placeret mellem det flankerende primerpar og mærket med et inaktivt fluorescerende farvestof. Under hvert forlængelsestrin ødelægger DNA-polymerase "proben", hvilket resulterer i frigivelsen af et målbart fluorescerende signal.

ÿ **Cyklustærsklen (Ct)** er det cyklusnummer, hvorefter fluorescensen bundet til det amplificerede PCR-produkt specifikt kan detekteres over baggrundssignalet. Ct-værdien er omvendt proportional med den oprindelige mængde af målet, så **jo lavere Ct-værdien er, desto mere målmateriale var der oprindeligt til stede.**

ÿ For en gyldig **kvantitativ PCR (qPCR) er** en ekstern standard med en kendt mængde mål-DNA, som prøvens Ct-værdi kan sammenlignes med, et absolut krav.

ÿ Til analyse af enkeltstrenget RNA (f.eks. i coronavirusser) skal RNA først reverseres transkriberes (RT) til DNA, før det kan underkastes PCR. Dette er kendt som **RT-PCR.**

ÿ På grund af den høje følsomhed af enhver type PCR er det af afgørende betydning at undgå enhver form for kontaminering, da **kontaminerende DNA vil blive amplificeret lige så effektivt som mål-DNA'et.** I

Machine Translated by Google

I værste fald kan en ny PCR-prøve allerede være kontamineret med amplificerede mål fra en tidligere PCR.

Det er vigtigt at bemærke, at dens høje følsomhed gør PCR til en fremragende teknik til at analysere ekstremt små mængder DNA (f.eks. inden for retsmedicin), men den åbner også døren for flere fejl og direkte bedrag, hvis metoden ikke anvendes korrekt (dvs. uspecifik testning af raske individer), eller hvis dens resultater ikke fortolkes korrekt (dvs. irrationel summering af PCR-positive "tilfælde").

"Der findes til dato ingen diagnostiske tests, der pålideligt kan bestemme tilstedeværelsen af infektiøs virus." [4]

Det hævdes, at et PCR-testpositivt "tilfælde" repræsenterer en smitsom person, men dette er IKKE SANDT.

ÿ Her er FAKTA

ÿ **Prøveforberedelse** før enhver form for PCR **kræver fuldstændig nedbrydning af biologiske strukturer** for at adskille nukleinsyrer fra proteiner, lipider og cellerester. Til dette formål behandles prøverne med en blanding af meget giftige kemikalier [5], hvilket fuldstændigt ødelægger enhver kompleks organisme.

ÿ Uanset protokoldesign **kan PCR udelukkende teste for tilstedeværelsen af den/de målsekvens(er)** udvalgt af specifikke primere, **som kun repræsenterer en lille del af hele virusgenomet.** Selv når PCR udføres korrekt, kan den på ingen måde bevise, at en infektiøs
virus med et intakt genom er til stede i en analyseret prøve.

ÿ **Et positivt PCR-testresultat alene kan ikke bevise tilstedeværelsen af en replikationskompetent, infektiøs virus.** Den repræsenterer udelukkende en molekylær indikator, der bekræfter eller afviser en initial mistanke, men kræver yderligere differentialdiagnose af en kliniker i sammenhæng med patientens symptomer - som det er tilfældet med enhver anden laboratorieanalyse!

ÿ Det er vigtigt at bemærke, **at symptomer på luftvejsinfektioner kan være forårsaget af en række forskellige vira** og endda bakterier, svampe eller protozoer, alene eller i kombination. Generelt er differentialdiagnose baseret på kliniske symptomer, der involverer yderligere laboratorieanalyser, f.eks. vækst af en forårsagende bakterie i kultur. **Testning for virusundertyper** kan være af videnskabelig interesse, men **har ingen relevans i en rutinemæssig klinisk sammenhæng,** da antivirusbehandlinger for det meste kun er symptomatiske, uafhængigt af virusundertyper eller kombinerede vira. Dette er tydeligvis forskelligt fra bakterier (dvs. antibiotika), svampe (dvs. antimykotika) eller protozoer (dvs. antibiotika).

ÿ Derfor **er multiplex-testning for en bred vifte af patogener obligatorisk for at skelne mellem forskellige lungeinfektioner, der manifesterer sig i lignende kliniske symptomer ,** og også for at skelne mellem forskellige familier af patogener eller, af hensyn til overvågning, for at evaluere den/de aktuelt cirkulerende patogen(er) [6]. På grund af PCR's høje følsomhed er det muligt at detektere RNA/DNA-sekvenser af en underrepræsenteret patogen inden for en kompleks patogenblanding, som det faktisk blev rapporteret for to af de første fem COVID-19-patienter [7].
Det er dog også muligt helt at overse et patogen, når specifikke PCR-prober for dette patogen ikke er inkluderet i testen.

ÿ Endelig er der stadig risiko for falsk positive og falsk negative resultater, der kan opstå som følge af både tekniske og kliniske fejl. **PCR-positive individer overfører eller bærer ikke nødvendigvis en intakt virus.** Denne uoverensstemmelse bliver tydelig blandt de PCR-positive, men asymptomatiske, raske individer, der udviser lave initiale måltal og høje Ct-værdier i deres testresultat. Langt de fleste af disse individer vil hverken bære patogenet eller være smitsomme. Den lave mængde virale nukleinsyrer, der påvises, kan enten udgøre rester af en

Machine Translated by Google

tidligere infektion eller, mere sandsynligt, udgøre et falsk positivt testresultat på grund af forkert prøvehåndtering og kontaminering.

Det hævdes, at PCR repræsenterer den "nye guldstandard" til test af smitsomhed, men det er IKKE tilfældet.
SANDT ÿ Her er FAKTA

ÿ **Guldstandarden for bestemmelse af den infektiøse virusmængde er reproducerbarheden af den pågældende virus i en korrekt cellekultur** [4]. Da håndtering af infektiøse vira kræver særlige sikkerhedsforanstaltninger, må sådanne tests kun udføres i specialiserede laboratorier og kan derfor ikke anvendes i rutinemæssig diagnostik.

ÿ I rutinemæssig diagnostik **kan PCR udføres som en erstatning** for at give lægen en beslutningsdygtig molekylær markør til den bedst mulige videre behandling af patienten.
Det er vigtigt at bemærke, at **PCR-testresultatet ikke må forstås som et simpelt ja-eller-nej-svar, men kræver en specifikation af en Ct-"cut-off"-værdi ,** der skal bestemmes på forhånd af et specialiseret laboratorium (sammenligning af PCR-resultater med resultater fra cellekultur) og efterfølgende skal justeres af det laboratorium, der udfører PCR-testen (sammenligning af PCR-resultater med resultater fra eksterne standarder, der indeholder inaktiveret virus med kendte koncentrationer).

ÿ Mens klinisk testning sigter mod høj sensitivitet for at bekræfte eller udelukke en mistænkt infektion hos en symptomatisk person, **er specificitet dog vigtigere end sensitivitet under en epidemi** [8] for at undgå at sende raske mennesker med falsk positive testresultater i unødvendig karantæne.

ÿ Høj følsomhed går hånd i hånd med en alvorlig flaskehals i PCR-udførelsen. Selv i tilfælde af 100 % testspecificitet, hvilket betyder, at der ikke er falsk positive resultater, betyder det kun, at ingen andre sekvenser end den/de valgte målsekvens(er) vil blive amplificeret. I den virkelige verden **vil kontaminanter og håndteringsfejl dog uundgåeligt resultere i generering af nogle falsk positive testresultater.**

ÿ Som allerede angivet ovenfor kræver absolut kvantificering af en defineret virusmængde i en specifik prøve qPCR, der involverer en fortyndingsrække af kendte mængder inaktiveret virus.
Efterfølgende kan Ct-værdien af en ukendt prøve korreleres med Ct-værdierne i fortyndingsserien, og mængden af viruspartikler kan estimeres for at bestemme virusmængden .
Et positivt PCR-signal som sådan tillader os ikke at drage konklusioner om en mulig infektiøs virusmængde, hvis der ikke angives en Ct-værdi, og hvis resultatet ikke specifikt er relateret til en defineret standardkurve [9].

ÿ Da revers transkription, primingbetingelser og sekundære strukturer ved primerbindingsstederne repræsenterer stokastiske processer, **kan Ct-værdien variere inden for et lille interval mellem forskellige PCR-tilgange og forskellige laboratorier.** Derfor er referencegener med definerede mængder obligatoriske for at måle relativ kvantificering mellem forskellige laboratorier.

ÿ En mulig replikationsaktivitet af en virus i et testet individ kan bevises ved et RT-PCR-assay, der er baseret på detektion af subgenomisk RNA (sgRNA), som udelukkende genereres under virusreplikation i inficerede celler. Da sgRNA imidlertid kan detekteres selv dage og uger efter infektion, indikerer fravær af sgRNA fravær af viral replikation, mens tilstedeværelsen af sgRNA ikke nødvendigvis indikerer smitsomhed [10].

Det hævdes, at PCR-massetests repræsenterer et passende værktøj til overvågning af virusspredning og befolkningens sundhed, men dette er IKKE SANDT ÿ Her er FAKTA

Machine Translated by Google

ÿ Da PCR ikke kan detektere eller forudsige, om en positivt testet person bærer eller kan overføre en intakt virus, **bør PCR-baserede laboratorieanalyser aldrig anvendes til overvågning af en asymptomatisk, rask population med det formål blot at detektere nukleinsyresekvenser fra et patogen.**

ÿ **Enhver laboratorieanalyse,** selv når den udviser både høj specificitet og høj sensitivitet, **vil generere falsk positive resultater, der endda kan overstige antallet af sande positive resultater, når prævalensen (antallet af reelt smittede personer) er lav,** hvilket netop er tilfældet ved massetestning af asymptomatiske individer [11].

ÿ **Positivt testede, raske individer udviser typisk lave initiale måltal** forbundet med høje Ct-værdier. Selv i tilfælde af at testaflæsningen er korrekt, **vil disse individer ikke være smitsomme, men repræsentere kliniske falsk-positive resultater,** der omfatter enten raskmeldte individer, som stadig viser virusrester, eller immune individer, som ikke er smitsomme på grund af en lav virusmængde [12].

ÿ Det diskuteres næppe, at **høj kapacitet (på grund af uspecifik massetestning)** af altid den samme PCR i et laboratorium vil øge risikoen for håndteringsfejl og generere enorme mængder aerosol [13], hvilket kan kontaminere den efterfølgende PCR-tilgang og **resultere i øgede falsk positive testresultater,** hvilket faktisk viste sig at være tilfældet i COVID-19-testning.

ÿ Den eneste tilgang, der ville reducere falsk positive resultater til nul, kræver udførelse af **Sanger-sekventering** [14], hvilket faktisk **anbefales af WHO** [15]. Men selv dette **ville ikke eliminere falsk positive resultater på grund af kontaminering.**

Det hævdes, at nye virusundertyper generelt repræsenterer øget smitsomhed og dødelighed, men

Dette er IKKE SANDT ÿ Her er fakta

ÿ Nye virusundertyper er karakteriseret ved små ændringer i deres nukleinsyresekvens, som IKKE nødvendigvis er forbundet med øget smitsomhed. Derudover er øget smitsomhed IKKE nødvendigvis forbundet med øget dødelighed. I modsætning hertil **har evolutionært succesfulde vira en tendens til at blive mere smitsomme, men mindre dødelige med hver efterfølgende mutation.**

ÿ **Nye virussubtyper er muligvis IKKE nye for vores immunsystem,** da tidligere kontakt(er) med vira af samme virusfamilie allerede kan have genereret krydsimmunitet. Dette blev faktisk påvist for SARS-CoV-2 i opbevarede bloddonorprøver fra tiden før COVID-19 [16,17,18].

Referencer [1] https://www.nytimes.com/1998/09/15/science/scientist-at-work-kary-mullis-after-the-eureka-a-nobelist-drops-out.html, [2] https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90469-4, [3] https://www.facebook.com/nico.davinci.56/videos/1749227998568399/, [4] https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w, [5] https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999, [6] https://doi.org/10.1002/14651858.CD013665, [7] https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722, [8] https://doi.org/10.1007/s10441-020-09393-w, [11] https://doi.org/ [9] ... [12] ... [10] ... [13] ... [4.govlm.ni] [4.govlm.ni] https : [17] https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015, [18] https://doi.org/10.1126/science.abh1823.

[16]

For detaljerede oplysninger om PCR, se følgende anmeldelse https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.71. til de

ViSdP: MWGFD eV, Wittgasse 9, 94032 Passau; info@mwgfd.org